

日 本 国 特 許 庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

J1035 U.S. PTO  
09/828211  
04/09/01

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

2000年 4月19日

出 願 番 号  
Application Number:

特願2000-118587

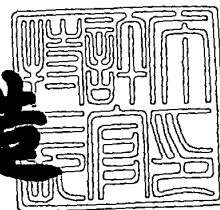
出 願 人  
Applicant(s):

株式会社島津製作所

2001年 2月 9日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3005920

【書類名】 特許願

【整理番号】 K1000103

【提出日】 平成12年 4月19日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12Q 1/68

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津  
製作所内

【氏名】 藤分 秀司

【特許出願人】

【識別番号】 000001993

【氏名又は名称】 株式会社島津製作所

【代理人】

【識別番号】 100085464

【弁理士】

【氏名又は名称】 野口 繁雄

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 037017

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9110906

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 核酸の塩基配列の変異検出方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 核酸の塩基配列の変異を検出する方法において、以下の工程 (A) 及び (B) を含むことを特徴とする変異検出方法。

(A) 塩基配列の検査部位を含む核酸又は核酸断片であり、複数種類の前記検査部位を含む分析対象物に、塩基配列が正常な前記検査部位のうちのいずれかに相補的な塩基配列をもち、蛍光物質で種類ごとに識別可能に標識された複数種類のオリゴヌクレオチドをハイブリダイズし、ホモ型接合部位及びヘテロ型接合部位を形成する接合工程、

(B) 逆相カラムと、前記蛍光物質を識別して検出できる検出器とを備えたイオンペアクロマトグラフを用い、前記逆相カラムの温度を前記ヘテロ型接合部位と前記ホモ型接合部位の安定性に差が生じる温度に調節して前記分析対象物を分析する検出工程。

【請求項 2】 前記工程 (A) の前に、前記分析対象物を増幅する増幅工程を含む請求項 1 に記載の変異検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、核酸 (DNA、RNA) の塩基配列の変異を検出する方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

多くの癌や遺伝子病は DNA の塩基配列の変異が原因になっていることが明らかにされている。その塩基配列の変異の大多数は一塩基置換である。塩基配列の変異を検出する技術分野では多くの方法が提案されている。以下にそのうちのいくつかを例示する。

【0003】

1) DNA (RNA) シーケンス：

分析対象物質の塩基配列を直接分析し決定する。最も確実な方法ではあるが、一連の操作にかかるコストが高価であるという欠点がある。また、スループットを上げようとする大規模な自動化ラインが必要となるという欠点もある。

【0004】

2) DNAチップ:

ガラス表面上に多数のオリゴヌクレオチドを固定化し、そのオリゴヌクレオチドにDNA断片などの分析対象物を選択的にハイブリダイズした後、そのハイブリダイズに基づく信号、多くの場合は蛍光信号を検出し、比較することにより分析対象物の配列を推定する。

しかし、DNAチップ自体が非常に高価であり、また、チップ上に固定化する多数のオリゴヌクレオチドを分析対象ごとに変える必要があるのでコストがかかるという欠点がある。

【0005】

3) SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) 法:

試料としての2本鎖DNA (RNA) を1本鎖DNA (RNA) にした後、1本鎖DNAの立体構造が塩基配列の違いで異なることを利用して、1本鎖DNAの立体構造の違いを電気泳動で検出し、塩基配列の変異の有無を推定する。

しかし、試料ごとに電気泳動の条件を検討する必要があり、また、ゲル電気泳動法を使用するため、スループットの向上が困難であるという欠点がある。

【0006】

4) DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography) 法:

DHPLC法は、例えば米国特許第5795976号に開示されており、イオンペアクロマトグラフィーを利用する。以下、DHPLC法について図1を参照して説明する。

(A) DNA断片をPCR (Polymerase Chain Reaction) 増幅する。ここではDNA断片として、塩基配列が正常な正常型DNA 2と、塩基配列に変異が存在する変異型DNA 4が混在している(図1 (A) 参照)。変異型DNA 4は、正常DNA 2と比べて図中下線部の塩基配列が異なっている。

【 0 0 0 7 】

(B) 正常型DNA 2 及び変異型DNA 4 が混在する状態で熱変性させて1 本鎖にし、その後、再接合させることにより、本来のペアの1 本鎖同士が再接合したホモ型接合部位 (homoduplex) 2 a, 4 a と、本来のペアとは異なる1 本鎖同士が接合したヘテロ型接合部位 (heteroduplex) 2 b, 4 b を形成する (図1 (B) 参照)。

ホモ型接合部位 2 a は正常型DNA 2 と、ホモ型接合部位 4 a は変異型DNA 4 とそれぞれ同じ塩基配列をもち、全ての塩基対について水素結合を形成している。しかし、ヘテロ型接合部位 2 b, 4 b には対応する塩基が適当でない (ミスマッチ) 部分 (図中下線部参照) が存在し、ミスマッチ部分では水素結合は形成されない。そのため、ホモ型接合部位 2 a, 4 a とヘテロ型接合部位 2 b, 4 b とでは安定性が異なり、ヘテロ型接合部位 2 b, 4 b の融解温度 (2 本鎖DNA の全濃度のうち5 0 % が1 本鎖DNA へ変性する温度) はホモ型接合部位 2 a, 4 a の融解温度に比べて低くなる。

【 0 0 0 8 】

(C) イオンペアクロマトグラフィーを原理とし、逆相カラムの温度をヘテロ型接合部位 2 b, 4 b の融解温度に設定することにより、ホモ型接合部位 2 a, 4 a とヘテロ型接合部位 2 b, 4 b を分離する。ヘテロ型接合部位 2 b, 4 b を形成していたDNA 断片は1 本鎖に開裂して2 本鎖よりも早く検出される。そのため、検出ピークが2 つ出現すれば、PCR 産物にホモ型接合部位 2 a, 4 a とヘテロ型接合部位 2 b, 4 b が存在していることになるので、増幅前のDNA 断片中の検査部位に変異のあるものが存在したことがわかる。

DHPLC 法において塩基配列の変異を検査する単位はエクソン単位である。エクソンとは、DNA の塩基配列のうち、最終的にアミノ酸配列としてタンパク質生合成の情報となり、読み取られ翻訳される部分をいう。

【 0 0 0 9 】

【発明が解決しようとする課題】

仮に、DHPLC 法を用いて複数のエクソン (検査部位) の変異を一度に分析した場合、どの検査部位に塩基配列の変異が存在したのかを調べることは不可能

なので、D H P L C 法では 1 回の分析で 1 ケ所の検査部位の塩基配列の変異しか判定できないという欠点がある。そのため、複数種類の検査部位の変異を検査する場合、加熱、再接合及び分析という一連の動作を各検査部位ごとに行なう必要があり、分析に要する時間及びコストがかかるという問題があった。

【 0 0 1 0 】

そこで本発明は加熱、再接合及び分析という一連の動作を 1 回行なうだけで、複数種類の検査部位の塩基配列の変異を識別して検査することのできる核酸の塩基配列の変異の検出方法を提供することを目的とするものである。

【 0 0 1 1 】

【課題を解決するための手段】

本発明は、以下の工程（A）及び（B）を含む核酸の塩基配列の変異を検出する方法である。

（A）塩基配列の検査部位を含む核酸又は核酸断片であり、複数種類の検査部位を含む分析対象物に、塩基配列が正常な検査部位のうちのいずれかに相補的な塩基配列をもち、蛍光物質で種類ごとに識別可能に標識された複数種類のオリゴヌクレオチドをハイブリダイズし、ホモ型接合部位及びヘテロ型接合部位を形成する接合工程、

（B）逆相カラムと、蛍光物質を識別して検出できる検出器とを備えたイオンペアクロマトグラフを用い、逆相カラムの温度をヘテロ型接合部位とホモ型接合部位の安定性に差が生じる温度に調節して分析対象物を分析する検出工程。

【 0 0 1 2 】

塩基配列の検査部位を含む核酸又は核酸断片であり、複数種類の検査部位を含む分析対象物を準備する。分析対象物の量が少ない場合は、増幅しておくことが好ましい。

塩基配列が正常な複数種類の検査部位のうちのいずれかに相補的な塩基配列をもち、蛍光物質で種類ごとに識別可能に標識された複数種類のオリゴヌクレオチド（蛍光標識オリゴヌクレオチドという）を準備しておき、分析対象物の各検査部位に対応する蛍光標識オリゴヌクレオチドをハイブリダイズする。塩基配列が正常な検査部位ではホモ型接合部位が形成され、塩基配列に変異がある検査部位

ではヘテロ型接合部位が形成される。

#### 【0013】

逆相カラムと、蛍光物質を識別して検出できる検出器とを備えたイオンペアクロマトグラフを用い、逆相カラムの温度をヘテロ型接合部位とホモ型接合部位の安定性に差が生じる温度に調節し、蛍光標識オリゴヌクレオチドをハイブリダイズした分析対象物を、イオンペア試薬を混合した移動相とともに逆相カラムに導入する。カラム中ではヘテロ型接合部位はホモ型接合部位に比べて解離される割合が多い。解離した蛍光標識オリゴヌクレオチドはハイブリダイズした状態の蛍光標識オリゴヌクレオチドに比べて早く溶出するため、ヘテロ型接合部位を形成していた蛍光標識オリゴヌクレオチドが早く溶出する。ここでヘテロ型接合部位とホモ型接合部位の安定性に差が生じる温度とは、ヘテロ型接合部位とホモ型接合部位で変性して解離する割合が異なる温度をいい、例えばヘテロ型接合部位の融解温度又はその付近の温度である。

複数種類の蛍光標識オリゴヌクレオチドはその蛍光物質特有の蛍光スペクトルで容易に相互に区別でき、どの検査部位にヘテロ型接合部位が形成されたかを知ることができるので、複数種類の検査部位について、それぞれ塩基配列の変異が存在するか否かを1回の分析で調べることができる。

#### 【0014】

##### 【実施例】

図2は、本発明に用いるイオンペアクロマトグラフの一例を表す概略流路構成図である。

イオンペア試薬としてのトリエチルアミンを含む移動相としてのアセトニトリル溶液をアセトニトリルの濃度を変えつつ供給するグラジェント溶出装置1が備えられている。

グラジェント溶出装置1にはアセトニトリル溶液を逆相カラム7へ送液する送液ポンプ3が接続されている。逆相カラム7としては内部表面が非多孔性ポリマーや非多孔性シリカなどの非多孔性物質で形成されており、その内部表面がアルキル基、例えばオクタデシル基（炭素が直鎖状に18個つながったもの）で修飾されているものを用いることができる。また、非多孔性ポリマーや非多孔性シリ

カなどの非多孔性物質を基材とし、それにオクタデシル基を結合した充填剤を逆相カラムに充填してもよい。

#### 【 0 0 1 5 】

送液ポンプ 3 と逆相カラム 7 の間の移動相流路には、試料溶液を移動相流路に注入するインジェクタ 5 が備えられている。逆相カラム 7 の周囲には、逆相カラム 7 の温度を調節するカラムオーブン 9 が備えられている。

逆相カラム 7 の溶出側は溶出成分を検出する検出器 1 1 に接続されている。検出器 1 1 としては複数の蛍光物質、例えば蛍光スペクトル特性の異なる 3 種類の蛍光物質 F 1 , F 2 , F 3 を相互に区別して検出できるものを用いた。

検出器 1 1 には、検出器 1 1 の出力に基づいて溶出液を分取するフラクションコレクタ 1 3 が備えられている。

#### 【 0 0 1 6 】

図 3 は、本発明にかかる核酸の塩基配列の変異検出方法の一実施例を説明するための図である。以下、その実施例について図 2 及び図 3 を参照して説明する。

複数のエクソンを含む DNA 断片（分析対象物）を PCR 増幅する。この例では分析対象物に正常型 DNA 1 5 と変異型 DNA 1 7 の両方が存在する（図 3（A）参照）。図 3 において、A はアデニン、C はシトシン、G はグアニン、T はチミンを表す。正常型 DNA 1 5 には検査対象となる 3 カ所のエクソン 1 5 a , 1 5 b , 1 5 c が存在する。変異型 DNA 1 7 には検査対象となる 3 カ所のエクソン 1 7 a , 1 7 b , 1 7 c が存在し、エクソン 1 7 a , 1 7 c にエクソン 1 5 a , 1 5 c と比べて塩基配列の変異（図中下線部参照）が存在する。

#### 【 0 0 1 7 】

塩基配列が正常なエクソン 1 5 a , 1 5 b , 1 5 c を構成する一方の鎖の配列に相補的な塩基配列をもち、蛍光物質 F 1 , F 2 , F 3 でそれぞれ標識した複数種類のオリゴヌクレオチド（蛍光標識オリゴヌクレオチド）1 9 a , 1 9 b , 1 9 c を準備する（図 3（B）参照）。用意するオリゴヌクレオチドはエクソン全体に対応している必要はなく、エクソンの検査したい部分のみに対応しているものであってもよい。また、多数の試料について同じエクソンの塩基配列の変異を検査する場合、蛍光標識オリゴヌクレオチドを予め大量に調製して準備しておく



ことにより、コストの低減につながる。

【 0 0 1 8 】

PCR増幅した正常型DNA 1 5 及び変異型DNA 1 7 と蛍光標識オリゴヌクレオチド 1 9 a, 1 9 b, 1 9 c を溶液中で混合し、その溶液を例えば 9 5 度の温度条件で 1 0 秒間加熱して正常型DNA 1 5 及び変異型DNA 1 7 を熱変性させて解離させた後、6 0 度の温度で 3 0 分間維持して試料溶液を調製する。これにより、蛍光標識オリゴヌクレオチド 1 9 a, 1 9 b, 1 9 c はそれぞれ対応するエクソン 1 5 a, 1 5 b, 1 5 c, 1 7 a, 1 7 b, 1 7 c の一方の鎖にハイブリダイズし、正常型DNA 1 5 の一方の鎖 2 1 にホモ型接合部位 2 1 a, 2 1 b, 2 1 c を形成し、変異型DNA 1 7 の一方の鎖 2 3 にヘテロ型接合部位 2 3 a, 2 3 c 及びホモ型接合部位 2 3 b を形成する（図 3 （C）参照）。ヘテロ型接合部位 2 3 a, 2 3 c において図中下線部の塩基がミスマッチを起こしているため、ヘテロ型接合部位 2 3 a はホモ型接合部位 2 1 a より融解温度が低く、ヘテロ型接合部位 2 3 c はホモ型接合部位 2 1 c より融解温度が低い。

【 0 0 1 9 】

接合部位を形成していない蛍光標識オリゴヌクレオチド 1 9 a, 1 9 b, 1 9 c を試料溶液中から除去した後、図 2 のイオンペアクロマトグラフを用いて試料溶液を分析する。

カラムオープン 9 により逆相カラム 7 をヘテロ型接合部位 2 3 a, 2 3 c の融解温度に調節する。グラジエント溶出装置 1 によりアセトニトリルの濃度を調節しつつ、トリエチルアミンを含むアセトニトリル溶液を送液ポンプ 3 により逆相カラム 7 へ送液する。試料溶液をインジェクタ 5 から注入し、トリエチルアミンと混合させ、逆相カラム 7 へ導入する。トリエチルアミンと混合されると、試料溶液中のホモ型接合部位 2 1 a, 2 1 b, 2 1 c, 2 3 b 及びヘテロ型接合部位 2 3 a, 2 3 c のリン酸基にトリエチルアミンが配位結合し、その部分の疎水性が向上する。

【 0 0 2 0 】

その状態で逆相カラム 7 へ導入されると、逆相カラム 7 はヘテロ型接合部位 2 3 a, 2 3 c の融解温度に調節されているため、ヘテロ型接合部位 2 3 a, 2

3 c はホモ型接合部位 2 1 a, 2 1 b, 2 1 c, 2 3 b に比べて逆相カラム 7 中で解離される割合が多くなる。鎖 2 3 から解離した標識オリゴヌクレオチド 1 9 a, 1 9 c は逆相カラム 7 による保持力が弱くなり、ハイブリダイズしている状態の標識オリゴヌクレオチド 1 9 a, 1 9 b, 1 9 c に比べて早く溶出する。

#### 【 0 0 2 1 】

図 4 は、この実施例のクロマトグラムを示す波形図である。縦軸は蛍光強度を示し、横軸は保持時間を示す。

F 1 用蛍光チャンネルの検出波形 2 5 a では 2 つの検出ピーク 2 7 a, 2 9 a が出現し、F 2 用蛍光チャンネルの検出波形 2 5 b では 1 つの検出ピーク 2 7 a が出現し、F 3 用蛍光チャンネルの検出波形 2 5 c では 2 つの検出ピーク 2 7 c, 2 9 c が出現している。検出波形 2 5 a, 2 5 c で 2 つの検出ピークが出現しているのは、ヘテロ型接合部位 2 3 a, 2 3 c を形成していた標識オリゴヌクレオチド 1 9 a, 1 9 c のうち解離したものが早く溶出したためである。すなわち、検出ピーク 2 7 a はホモ型接合部位 2 1 a (解離しなかったヘテロ型接合部位 2 3 a も含む)、検出ピーク 2 9 a はヘテロ型接合部位 2 3 a、検出ピーク 2 7 b はホモ型接合部位 2 1 b, 2 3 b、検出ピーク 2 7 c はホモ型接合部位 2 1 c (解離しなかったヘテロ型接合部位 2 3 c も含む)、検出ピーク 2 9 c はヘテロ型接合部位 2 3 c の存在をそれぞれ示している。

このようにして、PCR 増幅する前の分析対象物のエクソン 1 5 a, 1 7 a とエクソン 1 5 c, 1 7 c に対応する検査部位に塩基配列の変異が存在したことがわかる。

#### 【 0 0 2 2 】

本発明は、上記の実施例に限定されるものではなく、イオンクロマトグラフの構成、逆相カラムの構成、移動相及びイオンペア試薬はこの実施例に限定されるものではない。

上記の実施例では、同じ DNA 断片に存在する 3 つの検査部位について塩基配列の変異を検査しているが、本発明の分析対象物はこれに限定されるものではなく、複数種類の塩基配列の検査部位を含む核酸全体であってもよいし、検査部位を含む複数の核酸断片を混合したものであってもよいし、又はそれらの混合物で

あってもよい。

また、上記の実施例では逆相カラムの温度はヘテロ型接合部位の融解温度に調節しているが、本発明はこれに限定されるものではなく、ヘテロ型接合部位とホモ型接合部位の安定性に差が生じる温度であればよい。

【 0 0 2 3 】

【発明の効果】

本発明にかかる核酸の塩基配列の変異検出方法では、複数種類の塩基配列の検査部位を含む分析対象物に、塩基配列が正常な検査部位のうちのいずれかに相補的な塩基配列をもち、蛍光物質で種類ごとに識別可能に標識された複数種類のオリゴヌクレオチドを分析対象物の対応する検査部位にハイブリダイズし、逆相カラムと、蛍光物質を識別して検出できる検出器とを備えたイオンペアクロマトグラフを用い、逆相カラムの温度をヘテロ型接合部位とホモ型接合部位の安定性に差が生じる温度に調節し、標識オリゴヌクレオチドをハイブリダイズした分析対象物をイオンペア試薬を混合した移動相とともに逆相カラムに導入し、逆相カラムから溶出される複数種類の蛍光標識オリゴヌクレオチドを相互に区別して検出できるようにしたので、加熱、再接合及び分析という一連の動作を 1 回行なうだけで、複数種類の検査部位の変異を識別して検査することができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 D H P L C 法を説明するための図である。

【図 2】 イオンペアクロマトグラフの一例を表す概略流路構成図である。

【図 3】 一実施例を説明するための図である。

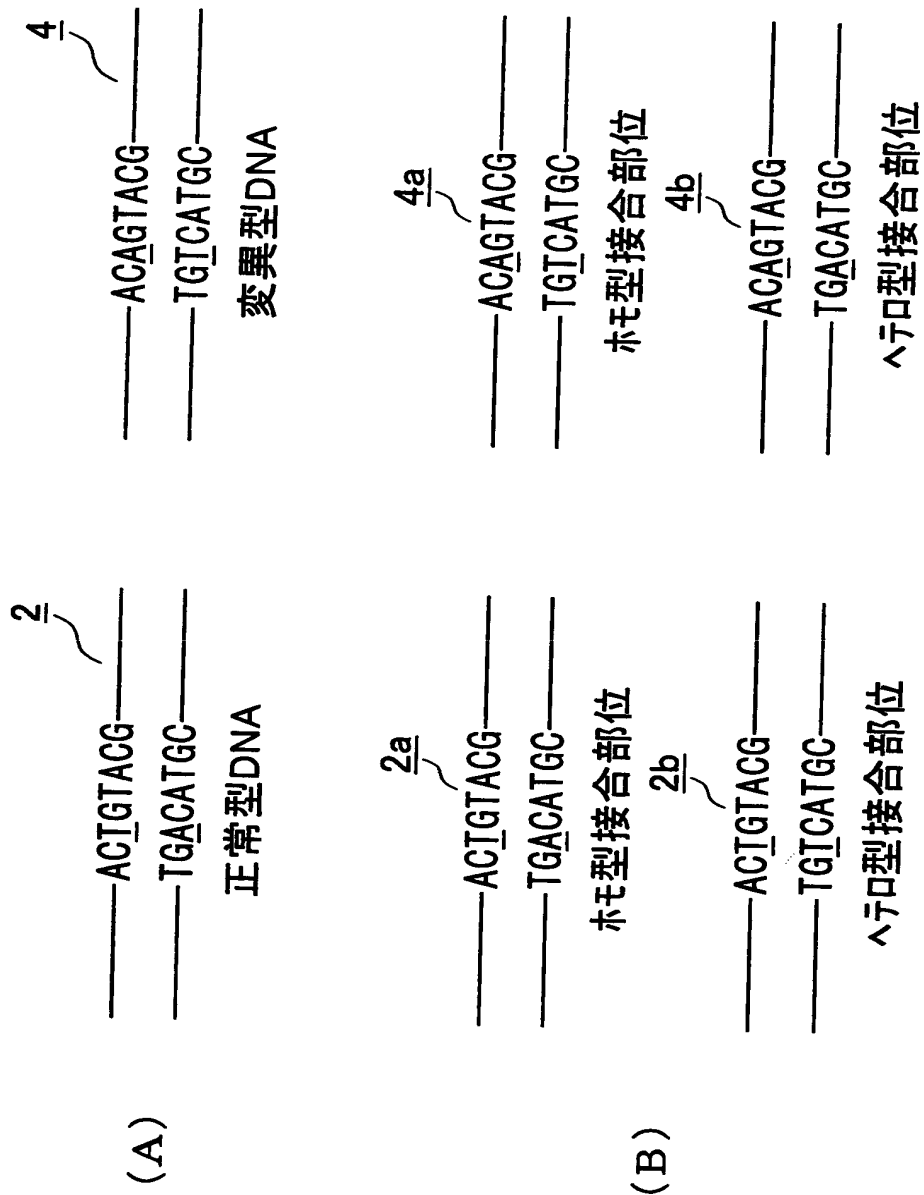
【図 4】 同実施例のクロマトグラムを示す波形図である。

【符号の説明】

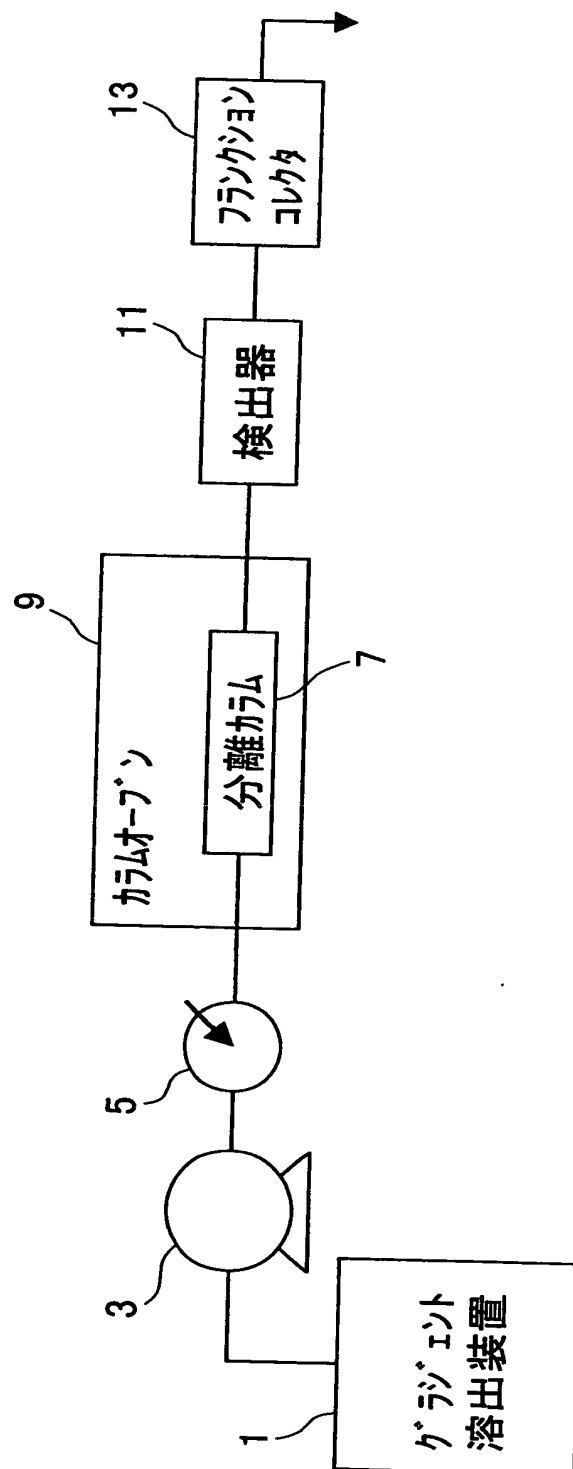
- 1        グラジエント溶出装置
- 3        送液ポンプ
- 5        インジェクタ
- 7        逆相カラム
- 9        カラムオープン
- 1 1      検出器

- 13 フラクションコレクタ
- 15 正常型DNA
- 15a, 15b, 15c, 17a, 17b, 17c エクソン
- 19a, 19b, 19c 蛍光標識オリゴヌクレオチド
- 21 正常型DNAの一方の鎖
- 21a, 21b, 21c, 23b ホモ型接合部位
- 23 変異型DNAの一方の鎖
- 23a, 23c ヘテロ型接合部位
- 25a F1用蛍光チャンネルの検出波形
- 25b F2用蛍光チャンネルの検出波形
- 25c F3用蛍光チャンネルの検出波形
- 27a, 27b, 27c, 29a, 29c 検出ピーク

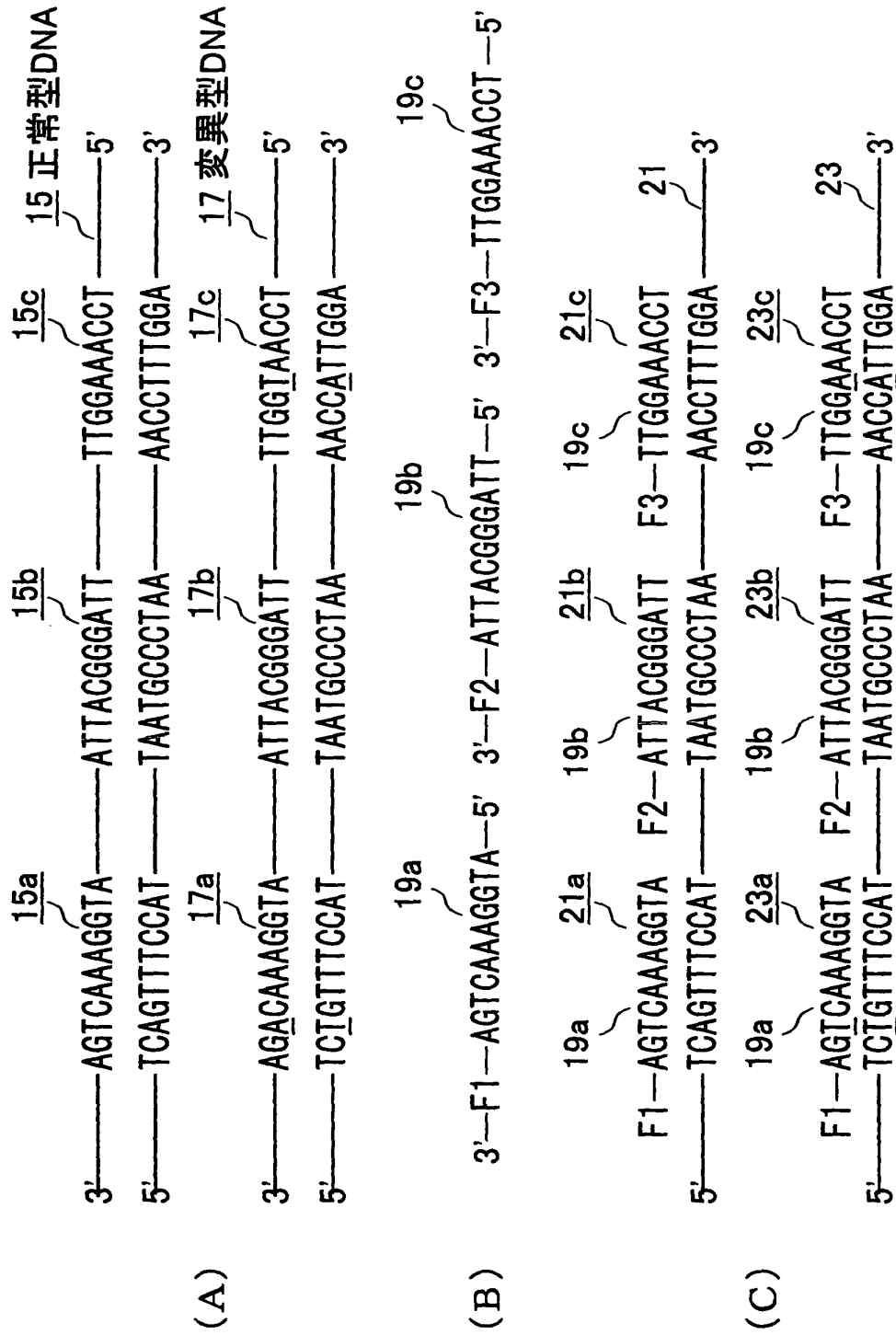
【書類名】 図面  
【図 1】



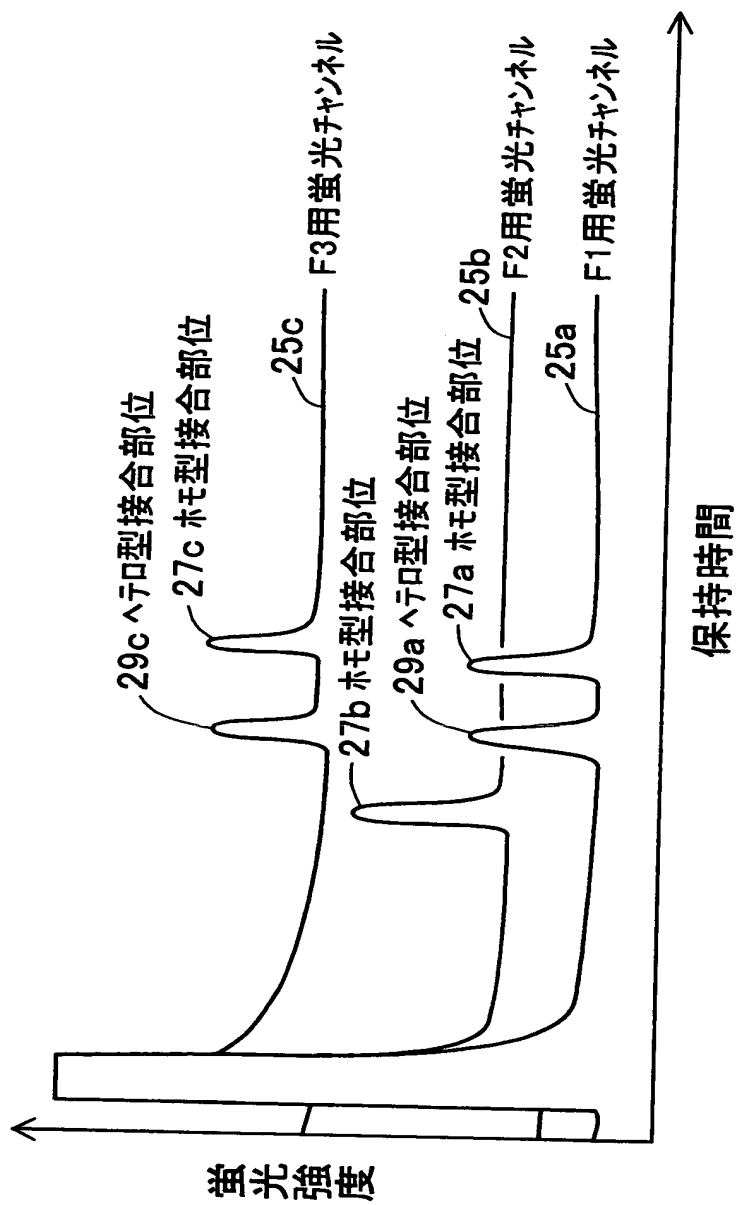
【図2】



【図 3】



【図4】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 PCR増幅、加熱、再接合及び分析という一連の動作を1回行なうだけで複数種類の塩基配列の変異を検査する。

【解決手段】 正常型DNA15と変異型DNA17を混合してPCR増幅する(A)。エクソン15a, 15b, 15cのいずれかに相補的で、蛍光スペクトル特性の異なる蛍光物質F1, F2, F3で標識された蛍光標識オリゴヌクレオチド19a, 19b, 19cを準備し(B)、増幅物にハイブリダイズし、ホモ型接合部位21a, 21b, 21c, 23b及びヘテロ型接合部位23a, 23c形成する(C)。ヘテロ型接合部位23a, 23cはホモ型接合部位21a, 21cに比べて融解温度が低いので、その融解温度に逆相カラムを調節したイオンペアクロマトグラフを用いて分析し、比較的早く溶出する蛍光標識オリゴヌクレオチド19a, 19cを識別して検出することにより、変異のあったエクソンを検知する。

【選択図】 図3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000001993]

1. 変更年月日

1990年 8月27日

[変更理由]

新規登録

住 所

京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地

氏 名

株式会社島津製作所